

課題名(タイトル):

自由エネルギー摂動法と拡張アンサンブル法を用いた高精度タンパク質-リガンド結合親和性予測

利用者氏名:

○尾嶋 拓(1)、李 秀榮(1)、松原 大貴(1)

理研における所属研究室名:

(1)生命機能科学研究センター 分子機能シミュレーション研究チーム

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

生体内タンパク質の多くは基質分子(リガンド)を結合して機能を発現する。タンパク質-リガンド間の親和性の予測は創薬化学の中心課題の1つである。昨今、高騰する医薬品開発費を抑えるために、標的タンパク質に強く結合する医薬品候補化合物を計算機シミュレーションにより予測する手法・技術に期待が寄せられている。高精度な親和性予測に広く用いられているのが、分子動力学(MD)シミュレーションによる自由エネルギー摂動法(FEP: Free Energy Perturbation)である。この方法は、熱力学サイクルを用いて、あるリガンドに摂動を与えて別のリガンドに変換させ、その際のタンパク質-リガンド結合自由エネルギー変化を求める。

FEP 法は結合ポーズが複数あるような場合に初期構造依存性や収束の問題があることが知られている。リガンド結合によるタンパク質構造の変化には長時間計算が必要となるため、共結晶構造データがない場合にはさらに困難になる。効率的な FEP 計算法を開発するために、申請者らは理研杉田チームで開発している分子動力学計算ソフト「GENESIS」に FEP 計算モジュールを新たに導入し、拡張アンサンブル法の1つである gREST 法と組み合わせた手法開発に取り組んできた。gREST 法では、系の一部の有効温度を向上させ、系のコピー(レプリカ)間で有効温度を交換させることで、自由エネルギー計算の収束性を向上させることができる。リガンドの結合自由エネルギーを計算し、gREST 法と FEP 法を組み合わせた方法を検証する必要がある。

本課題では、GENESIS に実装された FEP 法および gREST 法の有効性を検証するため、タンパク質-リガンド結合系に対して結合自由エネルギーを予測した。結合自由エネルギー計算には、リガンドの結合自由エネルギーの絶対値を求める「絶対結合自由エネルギー計算」と2つのリガンド間の結合自由エネルギーの差を求める「相対結合自由

エネルギー計算」の二種類がある。gREST 法と FEP 法を組み合わせた gREST+FEP 法を開発し、絶対結合自由エネルギー計算を行った。また、Lehigh 大学の Im 教授らが開発している CHARMM-GUI と連携することでセットアップを自動化し、GENESIS を用いて 相対結合自由エネルギー計算を行った。上記に加え、より発展的なターゲットとして、タンパク質-タンパク質間相互作用を FEP 計算で予測した。得られた予測値を実験データと比較し、手法の有効性を検証した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

(1) 絶対結合自由エネルギー計算

リガンドの結合自由エネルギーを予測するためには、タンパク質とリガンドの共結晶構造がない場合、リガンドの結合を推定する必要がある。ドッキング法で初期結合ポーズを作り、gREST 法でリガンドを結合サイト内で自由に動かせることで、最適なポーズを探索した。リガンドが結合サイトから離れていかないようにフラットボトム拘束ポテンシャルをかけた。リガンドが結合サイト近傍にいるときは何も力はかからないが、遠く離れると引き戻されるようになっている。FK506 Binding Protein (FKBP) とそのリガンド 10 種を用いた。gREST シミュレーションで得たトラジェクトリーから distance root-mean square (dRMS) の自由エネルギー地形を計算し、最小値を結合ポーズとして選んだ。

次に、gREST 法で得た結合ポーズの絶対結合自由エネルギーを FEP 法の1つである MP-CAFE 法を用いて求め、実験データと比較した。結合ポーズの影響を比較するため、ドッキング法で得た初期ポーズでの結合自由エネルギー、結晶構造での結合自由エネルギーも計算した。

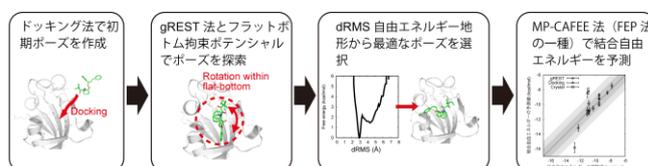


図 1. gREST+FEP 法のスキーム

(2) 相対結合自由エネルギー計算

FEP計算をするためには、事前にリガンドの分子構造や力場パラメータが必要である。相対結合自由エネルギー計算では、2つのリガンド間の構造およびパラメータの変化が起きるため、システムのセットアップが煩雑で難しかった。CHARMM-GUIと連携することで、煩雑なセットアップを自動化し、GENESISのFEP計算用インプットファイルも自動生成できるようにした。CHARMM-GUIで生成したインプットファイル等の動作検証のため、A2A Receptor とリガンド3種の相対結合自由エネルギーを計算し、実験データと比較した。

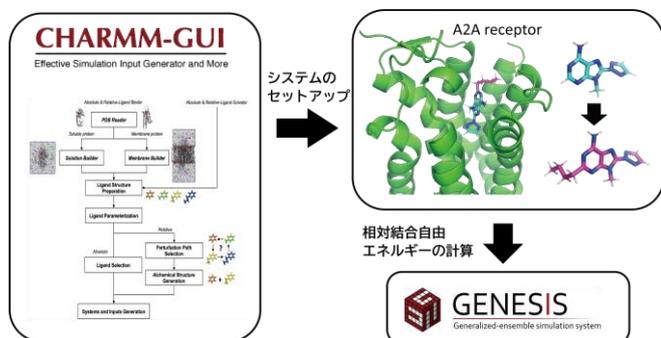


図 2. CHARMM-GUI と GENESIS との連携。CHARMM-GUI で構造と力場パラメータをセットアップし、GENESIS のインプットファイルも生成する。そのインプットファイルを用いて GENESIS の FEP 法で相対結合自由エネルギーを計算する。

(3) タンパク質-タンパク質間相互作用計算

タンパク質-タンパク質間の相互作用を理解するため、境界面のアミノ酸をアラニンに置換する実験が多数行われている。タンパク質-タンパク質の結合面のアミノ酸に摂動を与えて別のアミノ酸に置換し、その際の自由エネルギー変化を求め、実験データと比較することで FEP 計算を検証した。結合状態での計算と解離状態での計算を行うことで、熱力学サイクルからタンパク質-タンパク質結合自由エネルギーの変化 ($\Delta \Delta G$) を計算した。計算対象として、Barnase と Barstar の複合体を用いた。

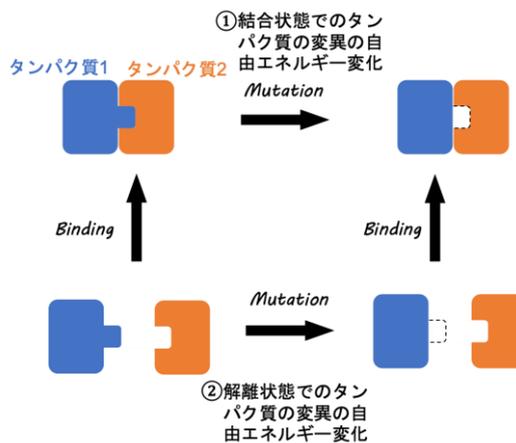


図 3. タンパク質-タンパク質結合とアミノ酸置換の熱力学サイクル

3. 結果

(1) 絶対結合自由エネルギー計算

ドッキング法で FKBP にリガンドを結合させたところ、最もスコアが良いポーズでも結晶構造を再現できないリガンドがあった(図4の右)。このポーズを初期ポーズにして、gREST法でMD計算し、トラジェクトリーからdRMSの自由エネルギー地形を求めたところ、図4の左のようになった。自由エネルギー地形には極小が2つあり、最小値に対応した結合ポーズは結晶構造とほぼ同じになることがわかった。同様の計算をすべてのリガンドに対して行い、結合ポーズを決定した。

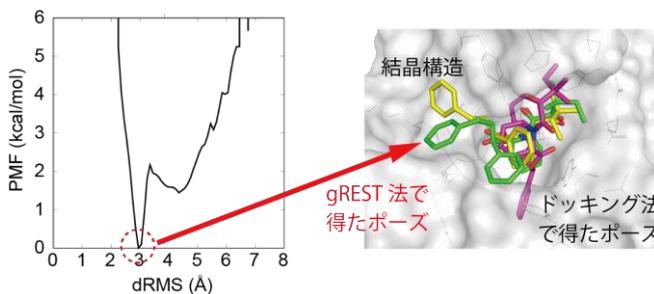


図 4. gREST 法で得たトラジェクトリーから得た dRMS の自由エネルギー地形と結合ポーズ (緑)。結晶構造 (黄色) とドッキング法で得た初期ポーズ (マゼンタ) も重ねて表示している。

gREST 法で得た結合ポーズを用いて計算した絶対結合自由エネルギーは図5のようになった。実験データを非常によく再現していることがわかる。一方、ドッキング法で得た結合ポーズの絶対結合自由エネルギーは実験値から大きくはずれている。FEP 法で絶対結合自由エネルギーを計算する場合、計算に用いる結合ポーズが決定的であることが

わかった。

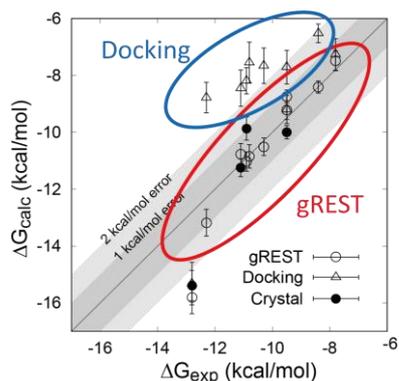


図 5. FKBP の絶対結合自由エネルギー。横軸は実験データ、縦軸は FEP 法で計算した結果。

(2) 相対結合自由エネルギー計算

図6の3つのリガンド間の置換に伴う自由エネルギー変化を求めた。結果は下表のようになった。GENESIS の FEP 法は実験結果を 1kcal/mol 以内で再現できている。このように CHARMM-GUI によるシステムのセットアップおよび GENESIS による計算が正しく機能していることが確認できた。

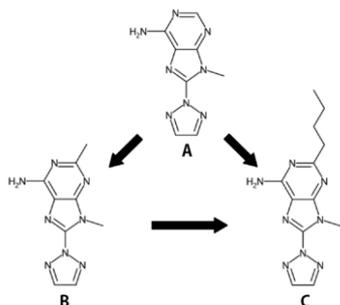


図 6. リガンドの置換

リガンドの置換	計算結果 (kcal/mol)	実験結果 (kcal/mol)
A → B	0.40 ± 0.05	0.25
A → C	-0.87 ± 0.12	-1.15
B → C	-1.05 ± 0.10	-1.40

(3) タンパク質-タンパク質間相互作用計算

Barnase-Barstar の複合体の Tyr29 を Ala に置換したときの自由エネルギー変化を計算した(図7)。結果は下表のようになり、実験データを非常によく再現できた。GENESIS に実装した FEP 法は、タンパク質の変異に対しても正しく計算できることが確認できた。

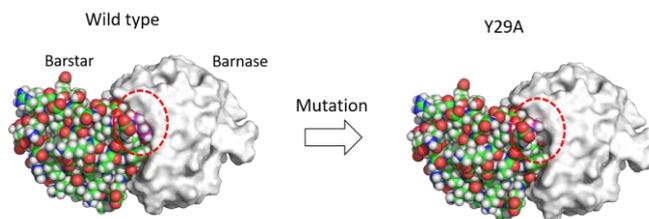


図 7. Barnase-Barstar の Y29A 変異。

アミノ酸置換	計算結果 (kcal/mol)	実験結果 (kcal/mol)
Y29A	3.31	3.4

4. まとめ

GENESIS に実装された FEP 法および gREST 法の動作および有効性を検証するため、三種類の結合自由エネルギー計算(絶対結合自由エネルギー、相対結合自由エネルギー、タンパク質-タンパク質間相互作用)を行った。gREST 法で結合ポーズを予測し、そのポーズの結合自由エネルギーを FEP 法で予測する gREST+FEP 法を開発した。gREST+FEP 法で、FKBP とそのリガンドの結合ポーズと絶対結合自由エネルギー計算をしたところ、結晶構造および結合自由エネルギーの実験値を再現することに成功した。次に、CHARMM-GUI と連携することで相対結合自由エネルギー計算のセットアップと GENESIS のインプットファイルの生成を自動化した。A2A Receptor とそのリガンドの置換の相対結合自由エネルギー計算を行ったところ、実験値を再現することができ、CHARMM-GUI および GENESIS が正しく機能していることが確認できた。最後に、GENESIS の FEP 法でタンパク質-タンパク質間相互作用を計算できるか検証するため、Barnase-Barstar の Y29A 変異の自由エネルギー変化を計算した。実験値を再現することに成功し、正しく機能していることが確認できた。

5. 今後の計画・展望

gREST 法でポーズを決め、その後 FEP 法で結合自由エネルギーを求める gREST+FEP 法では、gREST と FEP のシミュレーションを別々に行っている。FEP と gREST を同時に行う FEP/gREST 法では、1つのシミュレーションでポーズの決定と結合自由エネルギーの計算ができると考えられる。今後は FEP/gREST 法の有効性を検証したい。

2020 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

1. S. Kim, H. Oshima, H. Zhang, N. R. Kern, S. Re, J. Lee, B. Roux, Y. Sugita, W. Jiang, W. Im, “CHARMM-GUI Free Energy Calculator for Absolute and Relative Ligand Solvation and Binding Free Energy Simulations”, *J. Chem. Theory Comput.* 16, 7207–7218 (2020)
2. H. Oshima, S. Re, Y. Sugita, “Prediction of Protein-Ligand Binding Pose and Affinity Using the gREST+FEP Method”, *J. Chem. Inf. Model.* 60, 5382–5394 (2020)
3. D. Fujinami, H. Motomura, H. Oshima, A.-Al Mahin, K. M. Elsayed, T. Zendo, Y. Sugita, K. Sonomoto, D. Kohda, “Mosaic Cooperativity in Slow Polypeptide Topological Isomerization Revealed by Residue-Specific NMR Thermodynamic Analysis”, *J. Phys. Chem. Lett.* 11, 1934–1939 (2020).

【口頭発表】

1. 尾嶋拓, “タンパク質-リガンド結合の自由エネルギー計算法の開発と応用”, CBI 学会 2020 年大会, 2020 年 10 月 29 日, オンライン
2. 尾嶋拓, “Developments and applications of generalized-ensemble methods for free-energy analysis of protein-ligand binding”, 第 20 回日本蛋白質科学会年会, 2020 年 7 月 28 日, オンライン